

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

**LIJEČENJE KRONIČNIH BAKTERIJSKIH INFEKCIJA
- NOVI PRISTUP**

**TREATMENT OF CHRONIC BACTERIAL INFECTIONS
- NEW APPROACH**

Margareta Pernar

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor : doc. dr. sc. Ivana Ivančić - Baće

Zagreb, 2015.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. BAKTERIJSKA PERZISTENCIJA.....	2
2.1. OTKRIĆE I DEFINICIJA PERZISTENCIJE.....	3
2.2. AKTIVACIJA DORMANCIJE.....	4
3. RJEŠENJE ZA PERZISTENCIJU	5
3.1. ADEP4 AKTIVIRA ClpP PROTEAZU	6
3.2. USPJEŠNA DEGRADACIJA PROTEINA	7
3.3. ClpP MUTANTI.....	8
3.5. ADEP4 S RIFAMPICINOM ISTREBLJUJE INFEKCIJU <i>IN VIVO</i>	9
4. ZAKLJUČAK	10
5. LITERATURA	11
6. SAŽETAK.....	12
7. SUMMARY	13

1. UVOD

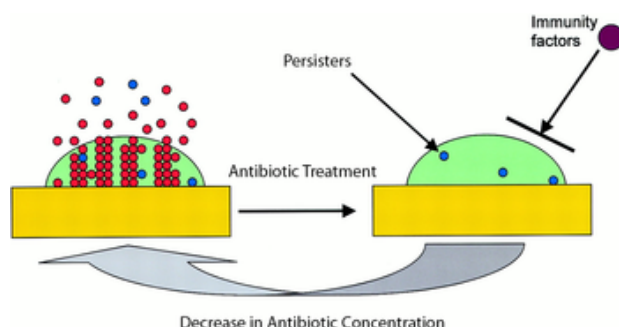
Kronične bakterijske infekcije javljaju se nakon akutnih infekcija zbog ponovne pojave patogena. Jedan od razloga je rezistencija bakterija na određeni antibiotik koja se javlja zbog mutacije gena. Drugi problem predstavlja bakterijska perzistencija. Usprkos tome što je bakterijska populacija koja je uzrokuje infekciju osjetljiva na antibiotik, neće doći do izlječenja već se infekcija vraća. Za tu pojavu odgovorni su bakterijski perzisteri - fenotipske varijacije normalnih bakterijskih stanica. Oni, aktivirajući putove koji vode do dormancije, preživljavaju antibiotsku terapiju jer su uobičajene antibiotske mete, transkripcija i translacija, ugašene, dok normalne bakterijske stanice bivaju ubijene. Kao rezultat, pacijent u početku pokazuje znakove ozdravljenja, ali se nakon nekog vremena perzisteri "bude", često jači i agresivniji nego prije, te se bolest vraća^{1,9}. Bakterijska perzistencija stoga predstavlja veliku prepreku za uspješno liječenje infektivnih bolesti. S obzirom na značajan negativni učinak, bakterijska perzistencija tema je brojnih znanstvenih istraživanja sa ciljem pronalaska komponente koja direktno djeluje na perzistere.

Kao jedna od mogućnosti pokazali su se ADEP (acyldepsipeptide) antibiotici. Svoju uspješnost ovi antibiotici duguju činjenici da ne djeluju na stanične procese potrebne bakterijama za život, već djeluju na određeni bakterijski enzim. Točnije, ADEP aktivira proteazu ClpP koja gubi sposobnost selekcije supstrata pa razgrađujući preko 400 bakterijskih proteina tjera stanice u smrt. Djelovanje ADEP-a i njegovog moćnijeg derivata ADEP4 *in vitro*, te mogućnost njihove primjene *in vivo*, tema je ovog rada^{1,9}.

2. BAKTERIJSKA PERZISTENCIJA

Kada je u pitanju otpornost na antibiotike, razlikujemo dva fenomena, rezistenciju i toleranciju. Za razliku od rezistentnih bakterija, čija otpornost na antibiotsku terapiju proizlazi iz genetičke različitosti uzrokovane mutacijama, perzisteri su fenotipske varijacije normalnih bakterijskih stanica s kojima su genetski identične. Perzisteri su tolerantni na konvencionalne antibiotike zahvaljujući svojoj sposobnosti ulaska u stanje dormancije. Bakterije u dormanciji imaju utišane stanične procese koji su uobičajena meta konvencionalnih antibiotika, zbog čega ostaju neoštećene nakon terapije. Nakon što se koncentracija antibiotika smanji, dolazi do obnove bakterijske populacije (slika 1)^{1,8}.

Tolerancija na antibiotike posebno dolazi do izražaja u slučaju biofilma. Biofilm formiraju bakterijske stanice pričvršćene za površinu koje izrastu u masu inkapsuliranu egzopolimernim matriksom. Brojne kronične bolesti povezuju se s biofilmovima, kao što su infekcije katetera, srčanih zalistaka, infekcije urinarnog trakta i brojne druge^{1,2,3}.



Slika 1. Model tolerancije biofilma na temelju preživljavanja perzistera. Početni tretman s antibiotikom ubija raspršene stanice i većinu stanica biofilma, dok imunosni sustav ubija raspršene perzistere. Međutim, perzistentne stanice unutar biofilma ostaju zaštićene od domaćina egzopolisaharidnim matriksom. Nakon pada koncentracije antibiotika, perzisteri obnavljaju bakterijsku populaciju⁸.

2.1. OTKRIĆE I DEFINICIJA PERZISTENCIJE

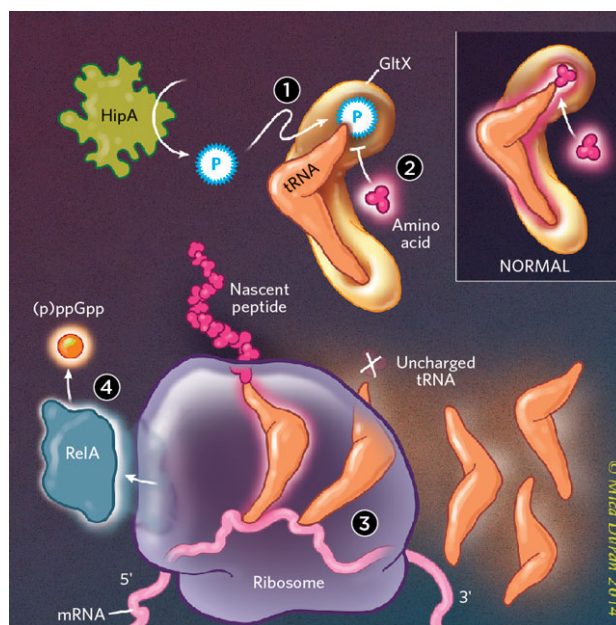
Fenomen perzistera otkrio je 1944. godine Joseph Bigger kada je primijetio da tretman populacije *Staphylococcus aureus* penicilinom ostavlja 1% populacije netaknutim, pa je te stanice nazvao perzisteri. Bigger je perzistere definirao kao male populacije dormantnih, nerastućih stanica koje nemaju naslijeđenu toleranciju na penicilin, ali su sposobne obnoviti populaciju pri čemu zadržavaju osjetljivost na antibiotik. Takva definicija ubrzo postaje neprecizna zbog heterogenosti perzistera, te zbog velike ovisnosti o uvjetima koji vladaju u određenoj kulturi^{1,7}.

Novija definicija perzistere opisuje kao nerastuće, odnosno spororastuće organizme, genetski identične ostalim stanicama, jednake osjetljivosti na antibiotik, koji preživljavaju izlaganje određenom antibiotiku i imaju sposobnost ponovnog rasta i obnavljanja populacije u visoko specifičnim uvjetima⁷.

2.2. AKTIVACIJA DORMANCIJE

U bilo kojoj bakterijskoj koloniji moguće je pronaći stanice koje će preživjeti tretman antibioticima. Za razliku od rezistencije koja je rezultat genske mutacije koja čini bakteriju neosjetljivom na određeni antibiotik, perzistencija proizlazi iz određene vrste staničnog sna. Tijekom tog stanja gase se stanične funkcije čime antibiotici gube metu. Bakterije sposobne za toleranciju posjeduju proteinski par, toksin - antitoksin. Toksin vodi stanicu u stanje dormancije, dok antitoksin ukida inhibiciju i budi stanicu^{1,4,5}.

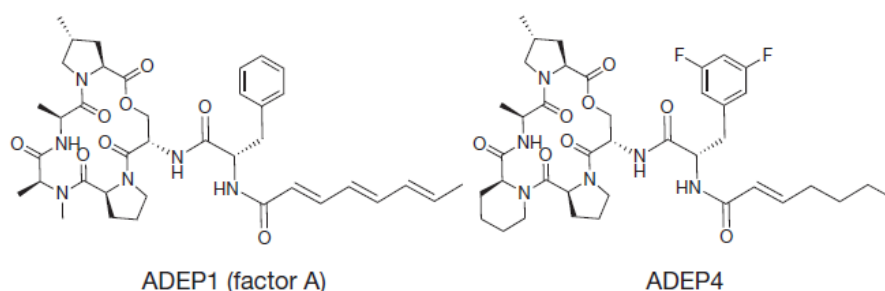
HipA je prvi toksin identificiran u *E. coli*, modelnom organizmu za proučavanje perzistencije. HipA djeluje kao kinaza koja fosforilira GltX (glutamil - tRNA sintetazu), protein koji tijekom translacije dodaje aminokiselinski ostatak na transfer RNA (tRNA). Fosforilacija sprječava GltX u dodavanju glutamina na tRNA. Takve prazne tRNA zaguše ribosom, što stimulira proizvodnju gvanozin tetrafosfata (ppGpp). On pokreće kaskadnu reakciju koja dovodi do gašenja esencijalnih staničnih procesa, kao što su replikacija, transkripcija, te stanica ulazi u dormanciju (slika 2)^{1,4}.



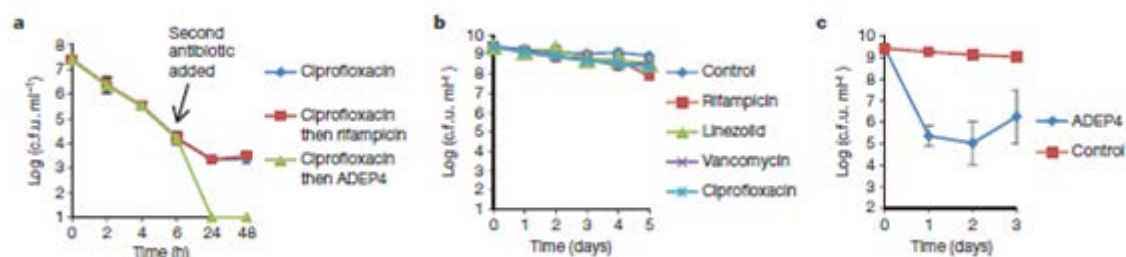
Slika 2. Put aktivacije dormancije. Fosforilacija GltX od strane HipA (1) onemogućava dodavanje aminokiseline na tRNA (2). Prazne tRNA zaguše ribosom (3) što dovodi do proizvodnje ppGpp od strane RelA (4) koji pokreće gašenje staničnih procesa⁴.

3. RJEŠENJE ZA PERZISTENCIJU

Model aktivacije dormancije daje jasnu sliku kako dolazi do formiranja perzistera, ali ne daje određenu metu na koju bi antibiotik mogao djelovati. Očito rješenje bilo bi djelovanje na toksin, međutim, *E. coli* ima barem 12 različitih toksina te bi bilo nemoguće inaktivirati sve od njih. Nova skupina antibiotika pod imenom ADEP (acyldepsipeptide), dobivena iz *Streptomyces hawaiiensis*, i njihov derivat ADEP4 (slika 3), pokazuju dobru aktivnost protiv Gram - pozitivnih bakterija i daju moguće rješenje u borbi protiv perzistera (slika 4)^{1,8}.



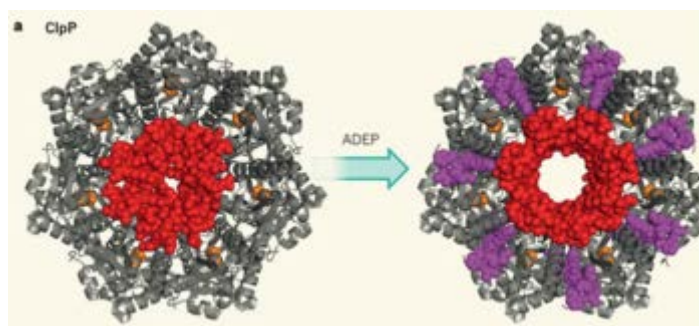
Slika 3. Struktura ADEP i njegovog derivata ADEP4¹



Slika 4. Kombinacija konvencijalnih antibiotika s ADEP - om. Sam tretman s antibiotikom nije dovoljan ako su u populaciji prisutni perzisteri, dok ih se dodatkom ADEP4 uspješno eliminira¹

3.1. ADEP4 AKTIVIRA ClpP PROTEAZU

U normalnim uvjetima, proteaza ClpP prepoznaje i uklanja krivo smotane proteine, zajedno s ATP - ovisnim ClpX, C i A podjedinicama šaperona. Proteolitička podjedinica Clp sastoji se od dva heptamerna prstena s malom centralnom porom kroz koju se peptidni lanac provodi u proteolitičku komoru. Mala veličina pore razlog je što je ClpP uglavnom inaktivan. Djelovanje ADEP-a se temelji na otvaranju pore proteaze ClpP (slika 5). Otvaranje ovog inače uskog i selektivnog kanala čini ClpP nespecifičnom proteazom sposobnom degradirati brojne bakterijske proteine i uzrokovati smrt stanice^{1,8,9}.

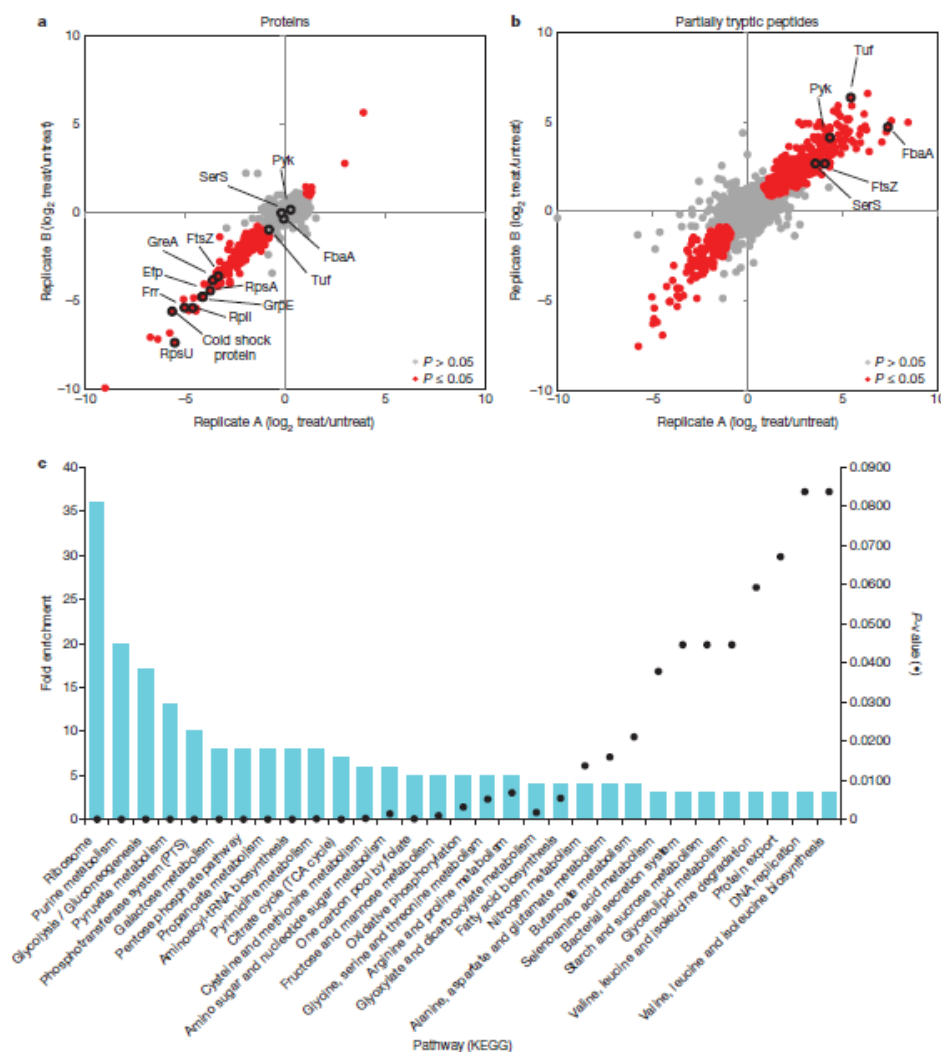


Slika 5. Otvaranje središnje pore. Konformacijska promjena uzrokovana vezanjem ADEP4¹

3.2. USPJEŠNA DEGRADACIJA PROTEINA

Istraživanja provedena s brzorastućim stanicama i kratkim vremenom izlaganja pokazala su da ADEP posebice cilja novonastale peptide i protein FtsZ (formira prsten prilikom diobe bakterijskih stanica). Daljnja pretpostavka bila je da bi duža inkubacija s ADEP-om rezultirala nespecifičnom razgradnjom proteina u nerastućim stanicama^{1,8}.

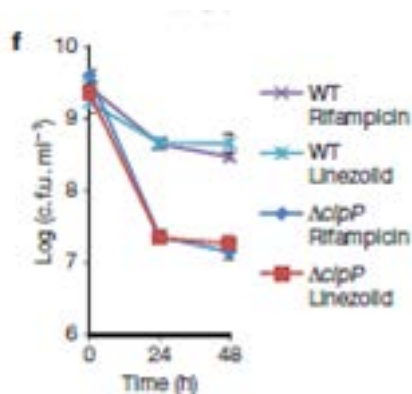
Za dokazivanje ove tvrdnje izabrana je meticilin - rezistentna populacija *S. aureus* (MRSA) u stacionarnoj fazi. Nakon 24 sata inkubacije, napravljena je proteomska analiza (slika 6). Od 1712 proteina detektirana u kontrolnim stanicama, 417 je degradirano u tretiranim stanicama. Najčešće žrtve su ribosomski proteini, FtsZ, te enzimi uključeni u metabolizam purina, glikolizu, te aminoacil - tRNA biosintezu^{1,8}.



Slika 6. Kvantitativna analiza proteoma *S. aureus* stanica tretiranih s ADEP4 otkriva opširnu degradaciju proteina¹.

3.3. ClpP MUTANTI

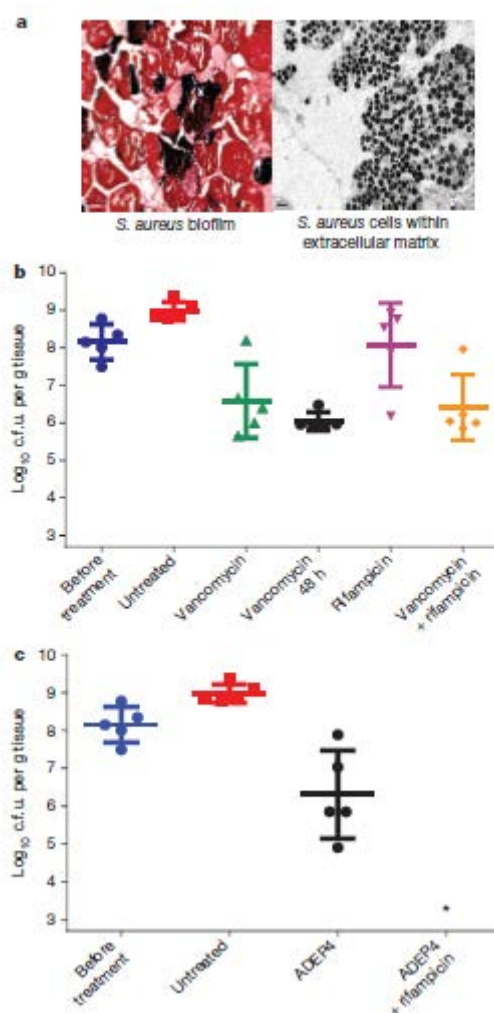
ADEP4 se dokazao uspješnim u ubijanju perzistera čime je premošćen nedostatak konvencionalnih antibiotika. Problem je što bakterije gotovo uvijek brzo razviju rezistenciju na novi antibiotik, pa je za očekivati da će tako biti i u slučaju ADEP4. Međutim, proteaze kao što je ClpP esencijalne su za opstanak stanice ili za virulenciju. Takvi mutanti, kao što je *null* mutant za *clpP*, rezistentni su na ADEP4, ali imaju smanjenu virulenciju, te su manje tolerantni na konvencionalne antibiotike (slika 7). Za supresiju rezistentnih mutanata, ADEP4 je kombiniran s drugim antibioticima, rifampicinom, linezolidom i ciprofloksacinom, gdje ADEP4 djeluje na normalne stanice, a drugi antibiotik na mutante (slika 7)^{1,9}.



Slika 7. ADEP4 rezistentni mutanti manje su tolerantni na rifampicin i linezolid od divljeg tipa¹

3.5. ADEP4 S RIFAMPICINOM ISTREBLJUJE INFEKCIJU *IN VIVO*

Kombinacija ADEP4 s rifampicinom pokazala se uspješnom u *in vitro* istraživanjima. Njihov učinak *in vivo* ispitan je na modelu mišje bedrene infekcije. Miš je tretiran s ciklofosfamidom kako bi se izazvala neutropenija, čime je oslabljen imunosti sustav, nakon čega je inficiran velikom dozom patogena. Dopušten je razvoj infekcije te je napravljena histopatološka analiza inficiranog bedra. Analizom su detektirani masivni agregati stanica *S. aureus* (slika 8a). Prema očekivanjima, primjena konvencionalnih antibiotika ili njihove kombinacije smanjila je broj vijabilnih stanica, ali nije uklonila infekciju (slika 8b), dok je kombinacija ADEP4 i rifampicina dovela do sterilizacije inficiranog tkiva (slika 8c)^{1,8}.



Slika 8. ADEP4 u kombinaciji s rifampicinom istrebljuje mišju bedrenu infekciju¹

4. ZAKLJUČAK

Patogeni kronične infekcije koji preživljavaju tretmane antibioticima predstavljaju veliki problem ne samo pacijentu koji trpi zbog ponovnog vraćanja infekcije, već i za društvo općenito. Takva populacija patogena plodno je tlo za razvoj rezistencije, stoga je istrebljenje infekcije važno i za sprečavanje širenja rezistencije.

Sposobnost odlaska u stanje dormancije koju perzisteri posjeduju i brojnost puteva koji vode do nje otežavaju liječenje infekcije. Rezultati su pokazali da konvencionalni antibiotici nisu uspješni u liječenju jer su njihove mete u perzisterima ugašene, već da perzisteri u biofilmu mogu biti ubijeni s antibiotikom koji aktivira proteaze. ADEP primjenjuje generalni princip rada antibiotika, aktivacija i izmjena funkcije mete. Vežući se za svoju metu, proteazu ClpP, on ju usmjerava u neselektivnu degradaciju proteina što odvodi stanicu u smrt. Kada se ADEP4 veže za ClpP, proteaza više ne zahtjeva ATP za svoju aktivnost. Ovo svojstvo čini ADEP4 odličnom komponentom za istrebljenje perzistera pošto oni imaju niski energetska nivo.

Razvoj rezistencije na ADEP moguć je putem mutacija, međutim rezultati su pokazali da u kombinaciji s rifampicinom dolazi do potpunog istrebljenja infekcije.

Ovo istraživanje pokazalo je da postoji veoma uspješno rješenje u borbi protiv perzistera, te je dalo bazu za razvoj novih lijekova koji bi također kao metu uzimali stanične proteaze. Taj pristup mogao bi se upotrijebiti na drugim organizmima osim bakterija, te pomoći u razvitku lijekova za gljivične infekcije i tumore.

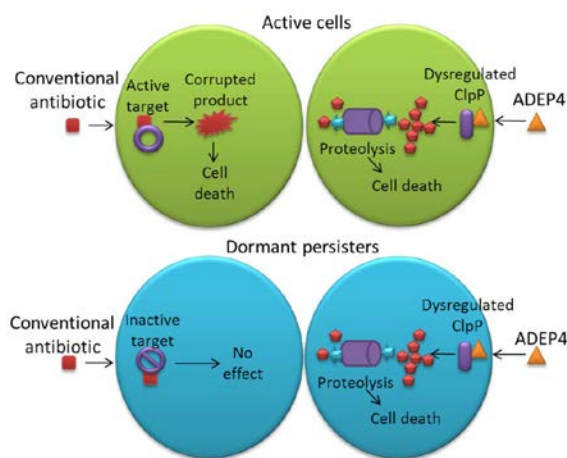
5. LITERATURA

1. Conlon, B. P., Nakayasu, E. S., Fleck, L. E., Isabella, V. M., Coleman, K., Leonard, S. N., Smith, R. D., Adkins, J. N., Lewis, K. 2013. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofil infection. *Nature* **503**, 365-370
2. Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., Shirtliff, M. E. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms, properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* **2**, 445-459
3. Periasamy, S., Joo, H. S., Duong, A. C., Bach, T. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y. C., Otto, M. 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1281-1286
4. Germain, E., 2013. The molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Molecular Cell* **52**, 248-254
5. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., Lewis, K. 2004. Specialized persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**, 8172-8180
6. <http://wyss.harvard.edu/viewpage/244/>
7. <http://www.nature.com/emi/journal/v3/n1/full/emi20143a.html>
8. <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2014/02/death-toll-to-persisters.html>
9. <http://www.bioworld.com/content/persistence-pays-researchers-developing-antibiotic-against-persisters>

6. SAŽETAK

Velik problem današnje medicine predstavlja razvoj rezistencije na antibiotike zbog visoke stope mutacija kod bakterija. Manje poznat, ali nikako manje bitan problem predstavljaju perzisteri - dormantne stanice koje iskazuju toleranciju na antibiotike. Perzisteri nisu karakteristični za određenu fazu staničnog ciklusa niti nastaju kao odgovor na antibiotik, već su stalno prisutni u populaciji. Te stanice glavni su uzrok kroničnih infekcija zbog svoje sposobnosti da obnove bakterijsku populaciju nakon tretmana konvencionalnim antibioticima.

Potreba za razvojem djelotvornije komponente dovela je do ADEP antibiotika, te derivata ADEP4 koji, za razliku od prijašnjih antibiotika, ne cilja stanične procese esencijalne za bakteriju, već djeluje na proteazu ClpP, okrećući je protiv vlastite stanice (slika 9). Pod utjecajem ADEP4, ClpP postaje neselektivna proteaza koja razgrađuje preko 400 bakterijskih proteina, što odводи stanicu u smrt. Ovakvi rezultati pokazuju visoku uspješnost ADEP4 u uklanjanja perzistera, dok njegova kombinacija s rifampicinom ili nekim drugim antibiotikom osigurava potpuno izlječenje infekcije.



Slika 9. Konvencionalni antibiotici ciljaju aktivne procese u bakterijskoj stanici što uzrokuje smrt (zeleno). U dormantnoj stanici (plavo), antibiotik nema utjecaja jer se veže za inaktivnu metu. ADEP4 aktivira ClpP i mijenja njezinu funkciju u aktivnim i dormantnim stanicama, te ih odводи u smrt¹.

Pozitivni rezultati djelovanja ADEP4 daju bazu za razvoj učinkovitijih antibiotika za liječenje kroničnih bakterijskih infekcija, ali i model rada koji je primjenjiv za druge bolesti, kao što su gljivične infekcije i tumori, gdje bi otkriće komponente koja bi djelovala na njihove proteaze moglo pomoći u razvoju lijekova za te bolesti.

7. SUMMARY

Antibiotic resistance represents serious problem in today's medicine due to high mutation rate in bacteria. Less known, but not less important problem are persisters - dormant cells tolerant to antibiotic treatment. Persisters do not appear at a particular stage in the cell cycle, nor they are produced in response to antibiotics. Instead, persisters are rare nongrowing cells preexisting in a population. Persister cells are the main cause of chronic infections due to their ability to revive and restore bacterial population.

Need to develop more efficient agent against persisters leads to ADEP antibiotics, and their derivative ADEP4. Unlike conventional antibiotics that kill bacteria by corrupting a cellular target that is active during bacterial growth, ADEPs activate the protease ClpP and causes it to become a more promiscuous enzyme, resulting in self-digestion of the bacteria's proteins, leading to cell death (Figure 9). These results show high efficiency of ADEP in killing persister cells, whereas its combination with rifampicin eradicates infection.

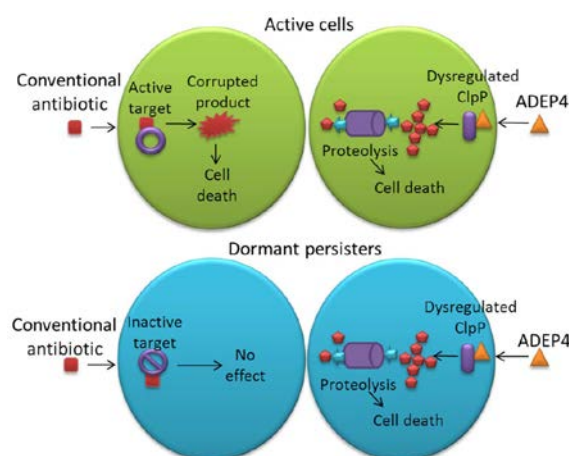


Figure 9. Conventional bactericidal antibiotics target active processes in bacterial cells resulting in death (green). In dormant persisters (blue), antibiotic binds an inactive target, producing no effect. ADEP4 activates and dysregulates ClpP in growing cells and dormant persisters, resulting in eradication of the bacterial population¹.

Positive results that ADEP4 shows give basis for development of more efficient treatments for chronic bacterial infections. Furthermore, its general principle of killing may be applied to other organisms as well and prove effective in developing cure to treat fungal infections and cancer.